Journal of Horticultural Science
https:// jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 2, Summer 2022, p. 343-353

Introduction of the Most Resistant *Juniperus* Genotypes to Drought Stress Based on Physiological and Antioxidant Traits

S. Keyghobadi[1*], R. Fotouhi Ghazvini[2], Y. Tajvar[3], A. Sabouri[4]

Received: 23-09-2020 Revised: 12-10-2020 Accepted: 15-11-2020 Available Online: 21-08-2022	**How to cite this article:** Keyghobadi S., Fotouhi Ghazvini R., Tajvar Y., and Sabouri A. 2022. Introduction of the Most Resistant *Juniperus* Genotypes to Drought Stress Based on Physiological and Antioxidant Traits. Journal of Horticultural Science 36(2): 343-353. (In Persian with English abstract) **DOI**: 10.22067/JHORTS4.V39I1.88559

Introduction

Drought is one of the most important environmental stresses that affects various plants such as ornamental plants. The identification and selection of ornamental tolerant genotypes is essential for landscape projects. Understanding the mechanisms that enable plants to adapt to drought stress can help to select the most tolerant genotypes for cultivation in arid and semi-arid regions.

Materials and Methods

For this purpose, a research was conducted as a factorial experiment based on completely randomized design with eleven genotypes and two levels of irrigation (irrigation as Control and severe drought) at Ramsar Citrus and Tropical Fruits Research Institute.

Results and Discussion

The first symptoms of drought stress were observed after 10 days in the *Juniperus horizontalis* (G1) genotype (the most sensitive genotype) and were not recovered and dried after 15 days. G3 and G5 genotypes (Ravande-mamouli and Ravande-setarei, respectively) showed drought stress after 28 days (most tolerant genotypes) and recovered at the end of the stress period after irrigation. Drought stress decreased photosynthetic pigments in studied genotypes. The content of soluble sugars, proline, and total soluble protein increased under drought stress conditions and the highest amount was observed in G3 genotype 30.8 mg g^{-1} DW, 30.5 µg g^{-1} DW, and 965.2 µg g^{-1}FW, respectively. Under drought stress condition, the highest concentration of hydrogen peroxide, malondialdehyde and electrical conductivity were observed in G11, G4, and G10 genotypes respectively compared to control plants. In addition, the most enzyme activity of superoxide dismutase (85.57%), total phenol (181.09%) and total flavonoid (98.46%) was evaluated in G3, G5 and G8 respectively. Also, chlorophyll changes indicate the response of plants to environmental stresses such as drought during drought stress, the concentration of abscisic acid and ethylene increases, which stimulates the activity of the enzyme chlorophilase and causes chlorophyll degradation. The reduction of photosynthetic pigments under drought stress also seems to be related to changes in nitrogen metabolism to proline production and reduced chlorophyll synthesis because the precursor of chlorophyll and proline is glutamate. Furthermore, one of the biochemical changes that occur in plants under drought stress is the accumulation of ROS. Numerous reports have stated that drought stress increases ROS production. Drought-induced oxidative stress causes lipid peroxidation and membrane damage. It seems that in some genotypes with low levels of malondialdehyde, the membrane damage is severe and leads to more electrical conductivity. Genotypes with more electrical

1- Ph.D. Student, Department of Horticultural Sciences, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran
(*- Corresponding Author Email: Saghi94k@yahoo.com)
2- Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3- Assistant Professor, Ramsar Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran
4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

conductivity are more damaged by drought stress. In some genotypes, such as G2 and G11, there was a positive correlation between malondialdehyde content and electrical conductivity, but in others, such as G1, there was a negative correlation. Although the amount of malondialdehyde in this genotype is low, electrical conductivity is very high. In other words, this genotype should be a genotype sensitive to drought stress. The tolerance of the plant to various environmental stresses may be related to the level of activity of the enzymes responsible for scavenging ROS. The antioxidant response to water scarcity depends on the severity of stress and type of plant species. Therefore, different genotypes increased their antioxidant activity to reduce the effects of oxidative stress, and the high antioxidant activity was observed for G5 compared with other genotypes which can be contemplated as drought-tolerant genotype. The accumulation of compatible metabolites such as soluble sugars and proline in plants under drought conditions can help to protect them against stress. The proline and soluble sugars accumulation under stress conditions reduce lipid peroxidation and acts as a free radical scavenger. According to the results, drought stress induced accumulation of proline and soluble sugars in the genotypes of *Juniperus* and the highest accumulation of proline was related to G3. Therefore, this genotype can be introduced as drought-resistant genotype.

Conclusion

The results of the current study showed that drought stress significantly affected some biochemical parameters in all eleven genotypes. However, a variation in drought susceptibility was observed among genotypes. The studied genotypes in this experiment had different responses to drought stress and it seems that they utilized different mechanisms for stress tolerance. Genotype of G3 (Ravande -mamouli) was the most tolerant genotype to drought stress based on the highest levels of superoxide dismutase, soluble sugars, proline, and soluble protein. Genotype of G5 was also tolerant to drought stress with high superoxide dismutase activity and the largest amount of total flavonoid production. Therefore, increasing of compatible metabolites and antioxidant system are effective protective mechanisms against oxidative damage under drought stress.

Keywords: Compatible metabolites, Environmental stress, *Juniperus*, Superoxide dismutase

نشریه علوم باغبانی
https:// jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص ۳۵۳-۳۴۳

معرفی مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌های سرو کوهی (*Juniperus* spp.) به تنش خشکی بر پایه شاخص‌های فیزیولوژیکی و آنتی اکسیدانی

ساقی کیقبادی[1]*- رضا فتوحی قزوینی[2]- یحیی تاجور[3]- عاطفه صبوری[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵

چکیده

خشکی یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که انواع گیاهان از جمله گیاهان زینتی را تحت تاثیر قرار می دهد. شناسایی و انتخاب ژنوتیپ-های مقاوم گیاهان زینتی برای اجرای پروژه‌های فضای سبز ضروری به نظر می رسد. بدین منظور پژوهشی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با یازده ژنوتیپ رونده اُرس، در دو سطح آبیاری (تیمار شاهد یا آبیاری و خشکی شدید) در آزمایشگاه پژوهشکده مرکبات و میوه‌های گرمسیری رامسر انجام شد. تنش خشکی موجب کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی گردید. محتوای قندهای محلول، پرولین و پروتئین محلول کل در شرایط تنش خشکی افزایش یافتند و بیشترین افزایش نسبت به گیاهان شاهد در ژنوتیپ G3 به‌ترتیب ۳۰/۸ میلیگرم بر گرم وزن خشک، ۳۰/۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک و ۹۶۵/۲ میکروگرم بر گرم وزن تر بدست آمد. همچنین بیشترین افزایش در میزان صفات پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ G11، مالون دی آلدئید در ژنوتیپ G4 و نشت یونی در ژنوتیپ G10 نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ G3 (۸۵/۵۷ درصد)، محتوای فنل کل در ژنوتیپ G5 (۱۸۱/۰۹ درصد) و فلاونوئید کل در ژنوتیپ G8 (۹۸/۴۶ درصد) مشاهده شد. ژنوتیپ G3 (رونده معمولی) بر مبنای بالا بودن مقادیر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، قندهای محلول، پرولین و پروتئین محلول نسبت به خشکی مقاومترین ژنوتیپ شناخته شد. ژنوتیپ G5 نیز به دلیل افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و افزایش تولید فلاونوئید کل در گروه ژنوتیپ‌های مقاوم قرار گرفت. بنابراین در ژنوتیپ‌های اُرس افزایش متابولیت‌های سازگار و سیستم آنتی اکسیدانی، مکانیسم حفاظتی کارآمدی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی است.

واژه‌های کلیدی: اُرس، تنش محیطی، سوپر اکسید دیسموتاز، متابولیت‌های سازگار

مقدمه

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که مراحل مختلف رشد و نمو گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در سال‌های اخیر، به علت تغییرات در شرایط آب و هوایی جهان و نیز افزایش سطح دی اکسید کربن اتمسفری، تنش خشکی بسیار شدیدتر شده است. به این ترتیب، شناسایی و انتخاب ارقام و ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم به تنش خشکی، بکارگیری شیوه‌های پایدار و استفاده از فناوری‌های کم‌آبیاری یک ضرورت است. شناخت مکانیسم‌هایی که گیاهان را قادر می‌سازد تا با تنش خشکی سازش پیدا کنند و رشدشان را تحت این شرایط ادامه دهند می‌تواند در انتخاب گیاهان مقاوم به تنش برای کشت در مناطق خشک و نیمه خشک کمک کند

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Saghi94k@yahoo.com)
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳- استادیار، پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه های نیمه گرمسیری رامسر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر
۴- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

DOI: 10.22067/JHORTS4.V39I1.88559

(Seleiman *et al.*, 2021).

در اثر تنش خشکی، فعالیت‌های فیتوشیمیایی گیاه محدود می‌شود، محتوای کلروفیل برگ تغییر می‌کند و فعالیت آنزیم‌های چرخه کلوین در فرآیند فتوسنتز مانند آنزیم روبیسکو کاهش می‌یابد (Kholova *et al.*, 2011). در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی، کاهش در تولید محصول تحت شرایط تنش خشکی غالباً به کم شدن ظرفیت فتوسنتزی مربوط است. تنش خشکی همچنین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد که تجمع آنها در سلول می‌تواند به تنش اکسیداتیو منجر شود (Hosseini-Boldaji *et al.*, 2012). در غیاب هر گونه مکانیسم حفاظتی، رادیکال‌های اکسیژن می‌توانند از طریق آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک متابولیسم طبیعی سلول را مختل کرده و در نتیجه آسیب غشا سلولی، موجب مرگ سلولی شوند. گیاهان دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند که تولید اضافی گونه‌های فعال اکسیژن را تحت شرایط تنش کنترل می‌کنند (Laxa *et al.*, 2019). مقاومت به تنش خشکی در گیاهان با توانایی حذف رادیکال‌ها و کاهش دادن آثار مضرشان مرتبط است. ارتباط بین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بالا رفتن مقاومت گونه‌های گیاهی تحت تنش‌های محیطی در چندین گونه گیاهی مانند زیتون (Zarabi *et al.*, 2010) و نارنگی (Tajvar *et al.*, 2011) تایید شده است. علاوه بر این، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های سازگاری گیاهان به شرایط کم آبی پدیده تنظیم اسمزی است که در درختان زیتون، پسته و بادام گزارش شده است که تحمل به تنش خشکی نتیجه تولید و یا تجمع محلول‌های اسمزی سازگار مانند پرولین و قندهای محلول است (Zarabi *et al.*, 2010). گیاهان با تجمع پرولین در سلول‌ها موجب کاهش پتانسیل اسمزی می‌شوند که این کاهش و به دنبال آن حفظ خاصیت جذب آب سلول و حفظ پتانسیل اسمزی سبب ادامه مراحل فیزیولوژیکی نظیر فتوسنتز، رشد و توسعه سلولی می‌شود (Siripornadulsil *et al.*, 2002).

جونیپروس‌ها یا اُرس‌ها گیاهان جهانی هستند که تقریباً در همه جا یافت می‌شوند. جنس جونیپروس (*Juniperus* spp.) از خانواده Cuperssaceae و شامل ۶۰ گونه است. گونه‌های این جنس همیشه سبز، به صورت درختانی بلند، کوتاه و یا درختچه‌ای و خزنده و معمولاً دو پایه و در مواردی تک پایه می‌باشند (Alguacil *et al.*, 2006). ایجاد فضای سبز با استفاده از گیاهان مقاوم به خشکی همانند اُرس‌ها به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک مورد توجه است. یکی از روش‌های غربالگری برای دستیابی به ژنوتیپ یا ارقام مقاوم اُرس‌ها بر مبنای صفات بیوشیمیایی است. در این مطالعه برخی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ژنوتیپ‌های مختلف اُرس‌ها در شرایط تنش خشکی بررسی خواهد شد تا بر مبنای آن ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر معرفی گردند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از نهال‌های سه ساله یازده ژنوتیپ مختلف اُرس (جدول ۱) استفاده گردید. نهال‌ها در گلدان‌های ۴/۵ لیتری محتوی خاک منطقه، شن و کود حیوانی به نسبت ۲:۱:۱ در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه موسسه تحقیقات مرکبات کشور در شهر رامسر در سال ۱۳۹۶ کشت شد. طراحی آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و سه نهال در هر واحد آزمایشی تنظیم گردید. فاکتورها شامل ژنوتیپ‌های مختلف اُرس و تیمار آبیاری شامل آبیاری کامل (شاهد) و تنش شدید خشکی (قطع آبیاری به مدت چهار هفته) بودند. رطوبت وزنی بستر محاسبه شد و با توجه به منحنی خصوصیات رطوبت خاک، پتانسیل ماتریک بستر کشت به دست آمد که در تیمار شاهد ۰/۰۳ مگاپاسگال و در تیمار خشکی شدید ۱/۵- مگاپاسگال بود. در شروع آزمایش گلدان‌ها به طور کامل آبیاری شده و بعد از زهکشی کامل و خروج آب اضافی قسمت پایین ساقه به منظور ممانعت از تبخیر و از دست دهی آب با کیسه پلاستیکی سیاه پوشانده شد تا تبخیر از سطح گلدان‌ها متوقف گردد. نمونه‌ها بعد از ظهور علایم خشکی هر تیمار برداشت و صفات بیوشیمیایی در آزمایشگاه پژوهشکده مرکبات و میوه‌های گرمسیری رامسر اندازه گیری شد.

سنجش رنگیزه های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئید، نمونه‌ها توسط حلال استون استخراج شدند. میزان جذب نوری عصاره‌ها برای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر نسبت به شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. محتوای کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید و بر اساس میلی‌گرم بر گرم بافت تر گیاه تعیین گردید (Lichtenthaler, 1987).

$$C_{a\ (mg.g^{-1}\ FW)} = 11/24A_{662} - 2/04A_{645}$$

$$C_{b\ (mg.g^{-1}\ FW)} = 20/13A_{645} - 4/19A_{662}$$

$$C_{t\ (mg.g^{-1}\ FW)} = 1000\ A_{470} - 1/9A\ C_a - 63/14C_b\ /\ 214$$

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های مختلف اُرس مورد استفاده در پژوهش
Table 1- The name of different genotypes of *Juniperus* used in the study

نام فارسی رایج Persian common name	نام علمی Scientific name	کد ژنوتیپ‌ها Genotype code
اُرس هوریزنتال	*Juniperus horizontalis*	G1
ساپینا سبز	*Juniperus Sabina*	G2
رونده معمولی	*Juniperus chinensis* var. Sargentii	G3
رونده اطلسی باکس	*Juniperus squamata* 'Blue Carpet'	G4
رونده یخی یا ستاره‌ای	*Juniperus procumbens* 'Nana'	G5
رونده کپه‌ای	*Juniperus ×pfitzeriana* 'Arctic'	G6
رونده کاموایی	*Juniperus chinensis* 'Globosa'	G7
رونده بلژیکی	*Juniperus chinensis* 'Kallay's compact'	G8
رونده ابلق	*Juniperus chinensis* 'Expansa Aureospicata'	G9
دم روباه سبز	*Juniperus chinensis* 'Shimpaku'	G10
ساپینا طلایی	*Juniperus Sabina*	G11

سنجش فنل کل

برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فنل و فلاونوئید کل، مقدار ۱ گرم از بافت تر گیاه با ۵۰ میلی لیتر متانول عصاره گیری شد. سپس عصاره‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ و روشناور برای سنجش فنل و فلاونوئید کل استفاده شد. برای سنجش فنل کل حلال به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین اضافه گردید. جذب نمونه‌ها بعد از گذشت ۳۰ دقیقه در طول موج ۷۲۰ نانومتر قرائت شد و در نهایت مقدار فنل کل نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین گردید (Meda *et al.*, 2005).

سنجش فلاونوئید کل

برای سنجش فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از گذشت ۴۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و در نهایت مقدار فلاونوئید کل نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین تعیین گردید (Chang *et al.*, 2002).

سنجش پروتئین‌های محلول کل و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[1]

مقدار ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) در هاون چینی سائیده شد. مخلوط به‌دست آمده در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید و روشناور بلافاصله برای سنجش پروتئین‌های محلول با روش برادفورد (Bradford, 1976) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم براساس اندازه‌گیری میزان ممانعت از احیاء نوری نیترو بلو تترازولیوم (NBT) توسط عصاره آنزیمی صورت گرفت (Winterbourn et al., 1977). مخلوط واکنش حاوی ۲/۷ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸)، ۱۰۰ میکرولیتر NBT ۰/۰۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA با غلظت ۷/۶ میلی‌مولار حاوی ۰/۰۲ میلی‌مولار از سیانید پتاسیم، ۵۰ میکرولیتر ریبوفلاوین ۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. محلول واکنش در شدت نور ۴۰ وات به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفت و سپس جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر ثبت گردید. مقدار آنزیم لازم برای ممانعت ۵۰ درصدی از احیاء نوری NBT به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین ($U.mg^{-1}$ protein) بیان گردید (Winterbourn et al., 1977).

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA)

برای اندازه‌گیری شاخص پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون دی آلدئید ارزیابی شد. مالون دی آلدئید در واکنش با تیوباربیوتیک اسید تشکیل کمپلکس رنگی داده که در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب دارد. در نهایت مقدار مالون دی آلدئید با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف از ۳، ۱، ۱، ۳ - ترا اتوکسی پروپان محاسبه گردید (Boominathan and Doran, 2002).

1- Superoxide dismutase

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

سنجش غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری پس از واکنش با یدید پتاسیم در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و از غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد (Harinasut *et al.*, 2003).

سنجش نشت یونی

سنجش نشت یونی به وسیله دستگاه EC متر (HANNA9812) و طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن MSI نشانگر شاخص تمامیت غشاء بر حسب درصد و c_1 و c_2 به ترتیب نشانگر هدایت الکتریکی عصاره برگی در دمای ۴۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشند (Sairam *et al.*, 2002).

$$MSI = \left[1 - \left(\frac{c_1}{c_2}\right)\right] \times 100$$

سنجش قندهای محلول

اندازه‌گیری قندهای محلول با استفاده از روش فنل- اسید سولفوریک که مبتنی بر آبگیری از قندهای محلول و تشکیل ترکیب فورفورال است صورت گرفت. میزان جذب ترکیب حاصل در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و مقدار قندهای محلول نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف گلوکز محاسبه گردید (Kochert *et al.*, 1978).

سنجش پرولین

برای سنجش پرولین، ۲ میلی‌لیتر از عصاره برگ (استخراج از طریق محلول سولفوسالسیلیک اسید ۱۰ درصد) با ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید مخلوط گردید. محلول حاصل پس از هم زدن به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس بلافاصله در داخل یخ سرد شد و به دمای اتاق رسید. به محلول فوق ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید که پس از ورتکس دو فاز جداگانه تشکیل شد. با قرائت جذب فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین نمونه‌ها ارزیابی گردید (Bates *et al.*, 1973).

تجزیه تحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیه‌های آماری با نرم‌افزار (ver. 9.2 SAS) انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ ترسیم گردید.

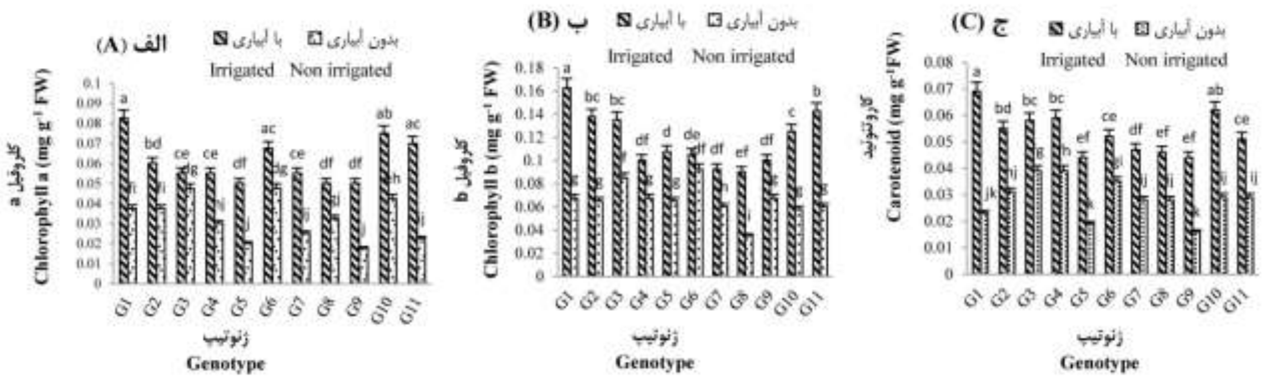
نتایج و بحث

رنگیزه‌های فتوسنتزی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی به طور معنی‌داری تحت تاثیر آبیاری و ژنوتیپ قرار گرفت. برهمکنش اثر آبیاری و ژنوتیپ نیز برای غلظت رنگیزه‌ها معنی‌دار بود ($p\leq۰/۰۵$). تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار ($p\leq۰/۰۵$) غلظت کلروفیل a، b و کارتنوئید در ژنوتیپ‌های مورد بررسی گردید. تحت تنش خشکی بیشترین کاهش غلظت کلروفیل a در مقایسه با سطح آبیاری در ژنوتیپ‌های G_5، G_7، G_9 و G_{11} به ترتیب ۶۰، ۵۰، ۶۶ و ۶۸ درصد بدست آمد (شکل ۱، A). تنش خشکی همچنین موجب کاهش غلظت کلروفیل b در ژنوتیپ‌های مورد بررسی گردید و بیشترین میزان کاهش در ژنوتیپ G_8 (۶۱ درصد) مشاهده گردید (شکل ۱، B). غلظت کاروتنوئید در تنش خشکی در ژنوتیپ‌های G_1، G_5 و G_9 به ترتیب ۵۶/۸۱، ۶۳/۶۳ و ۶۶/۶۶ درصد کاهش یافت (شکل ۱، C). تغییرات کلروفیل نمایانگر واکنش گیاهان به تنش‌های محیطی مانند خشکی است. طی تنش خشکی غلظت آبسیزیک اسید و اتیلن افزایش می‌یابد که تحریک‌کننده فعالیت آنزیم کلروفیلاز می‌باشد و سبب تخریب کلروفیل می‌گردد. همچنین به نظر می‌رسد کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تنش خشکی مربوط به تغییر متابولیسم نیتروژن برای ساخت پرولین و کاهش سنتز کلروفیل باشد چرا که پیش‌ساز کلروفیل و پرولین، گلوتامات است (Saleem *et al.*, 2011). مدتی که گیاه قادر است رنگیزه‌های فتوسنتزی را حفظ کند موجب بقاء بیشتر گیاه شده و عدم خسارت در شرایط تنش را سبب می‌گردد. به عبارت دیگر اگر گیاه به سرعت سطح رنگیزه‌هایش را کاهش دهد به مفهوم حساس بودن آن ژنوتیپ در برابر تنش خشکی است. براساس این شاخص ژنوتیپ‌های G_1، G_{10} و G_{11} احتمالاً نتوانستند شرایط خشکی را تحمل کنند و به عنوان ژنوتیپ‌های حساس به خشکی معرفی شدند. نتایج مشابهی از کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در شش رقم زیتون (Zarabi *et al.*, 2010) نیز در شرایط خشکی گزارش شده است.

غلظت مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن و نشت یونی

برابر نتایج تجزیه واریانس غلظت مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت یونی برگ به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمار آبیاری و ژنوتیپ قرار گرفت. میانگین مقادیر غلظت مالون دی‌آلدئید ناشی از برهمکنش اثرات سطح آبیاری و ژنوتیپ در این مطالعه معنی‌دار شد ($p\leq۰/۰۵$). در شرایط تنش خشکی تولید مالون دی آلدئید در مقایسه با شرایط آبیاری افزایش یافت به‌ویژه در ژنوتیپ‌های G4، G5 و G8 که غلظت این ماده ۴/۵، ۲/۸ و ۳/۱ برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت.

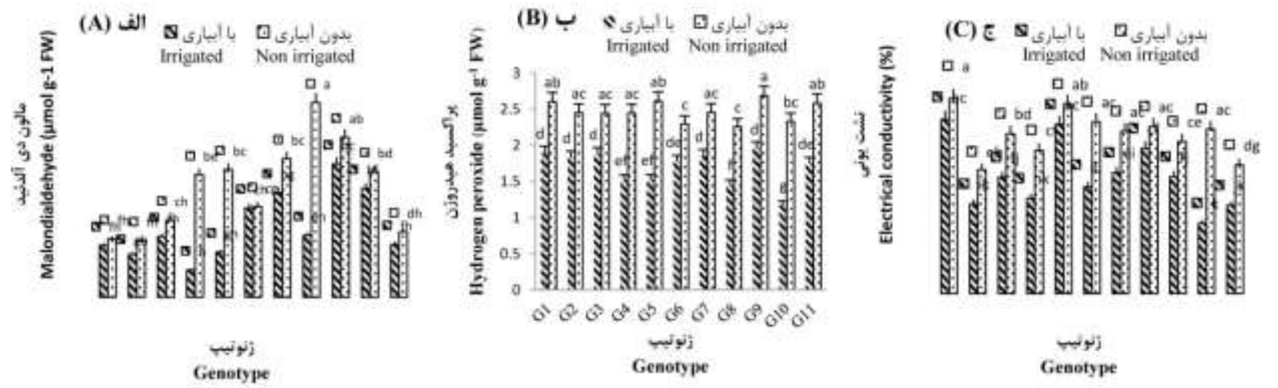


شکل ۱- برهمکنش اثرآبیاری ×ژنوتیپ بر غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی ژنوتیپ‌های مختلف اُرس. A)- کلروفیل B a)- کلروفیل C b)- کاروتنوئید

Figure 1- The interaction effect of irrigation ×genotype on the content of photosynthetic pigments of the various genotypes of *Juniperus*. A) Chlorophyll a, B) Chlorophyll b, and C) Carotenoid. (DMRT, *p≤0.05*)

اگرچه در سایر ژنوتیپ‌ها نیز افزایش مالون دی آلدئید مشاهده شد لیکن نسبت به گیاهان آبیاری شده غلظت آن‌ها چندان بالا نبود (شکل ۲، A). همچنین، بیشترین میزان تولید پراکسید هیدروژن و نشت یونی در مقایسه با سطح آبیاری در ژنوتیپ G10 به ترتیب ۹۸ و ۱۳۳/۹۸درصد به دست آمد (شکل ۲، B و C). یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاهان تحت تنش خشکی اتفاق می‌افتد، تجمع ROS است. تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی سبب پراکسیداسیون لیپیدها و صدمه به غشاها است. تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، تغییر در نفوذپذیری غشاها، کاهش پایداری غشاها و افزایش نشت یون‌ها می‌گردد. خشکی با افزایش تدریجی اتیلن نیز سبب ناپایداری غشاها می‌شود (Hosseini-Boldaji *et al*., 2015). تنش اکسیداتیو توسط سطوح بالای مالون

دی آلدئید در دانه رست برنج (Farooq *et al*., 2009) و مرکبات (*et* Fifaei *al*., 2015) تحت تنش خشکی مشاهده است. به نظر می‌رسد در برخی ژنوتیپ‌ها با مقادیر کم مالون دی آلدئید آسیب غشا شدید بوده و منجر به نشت یونی بیشتر می‌شوند. ژنوتیپ‌هایی با نشت یونی بیشتر، از تنش خشکی آسیب بیشتری دیده‌اند. در برخی ژنوتیپ‌ها مانند ژنوتیپ‌های G2 و G11 همبستگی مثبت بین میزان مالون دی آلدئید و نشت یونی آنها وجود دارد ولی در بعضی دیگر مانند ژنوتیپ G1 همبستگی منفی دیده می‌شود. به رغم آنکه مقدارمالون دی آلدئید در این ژنوتیپ کم است ولی نشت یونی خیلی زیاد است. به عبارت دیگر این ژنوتیپ باید ژنوتیپ حساسی در برابر تنش خشکی باشد. با توجه به روند این دو صفت پایداری غشاء ژنوتیپ های G3، G4 و G9 نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بیشتر است.

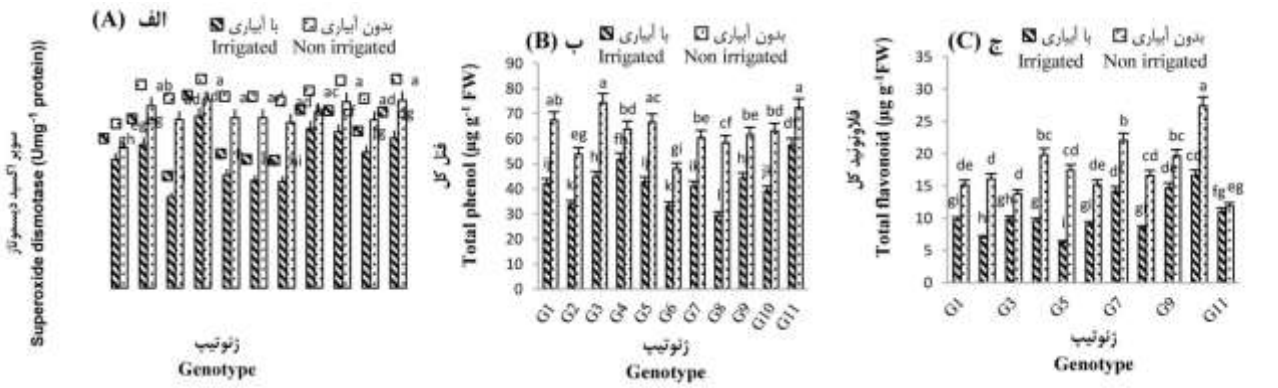


شکل ۲- برهمکنش آبیاری × ژنوتیپ بر غلظت مالون دی آلدئید (A)، پراکسید هیدروژن (B) و نشت یونی (C) ژنوتیپ‌های مختلف اُرس

Figure 2- The interaction effect of irrigation ×genotype on malondialdehyde (A), hydrogen peroxide (B), and electrical conductivity (C) of the various genotypes of *Juniperus*. s (DMRT, *p≤0.05*)

سیستم آنتی اکسیدانی (فنل کل، فلاونوئید کل و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز)

نتایج تجزیه واریانس داده‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی نشان داد که محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به طور معنی‌داری تحت تاثیر آبیاری و ژنوتیپ قرار گرفت. برهمکنش مقایسه میانگین داده‌های اثر آبیاری و ژنوتیپ نیز برای سه صفت فنل کل، فلاونوئید کل و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح معنی‌دار ($p≤۰/۰۵$) بود. تنش خشکی موجب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، محتوای فلاونوئید و فنل کل در ژنوتیپ‌های مورد بررسی گردید. بیشترین فعالیت آنزیم در مقایسه با تیمار آبیاری در ژنوتیپ G_3 برابر ۸۵/۵۷ درصد بدست آمد (شکل ۳، A). محتوای فنل کل در مقایسه با سطح آبیاری در بالاترین سطح در ژنوتیپ G_8 (۹۸/۴۶ درصد) مشاهده شد. در ژنوتیپ‌های G_1، G_3 و G_{10} نیز افزایش محتوای فنل کل قابل توجه بود و به ترتیب ۶۰/۲۲، ۶۵/۹۸ و ۶۱/۱۲ درصد بدست آمد (شکل ۳، B). همچنین، بیشترین میزان تولید فلاونوئید کل در تنش خشکی در مقایسه با سطح آبیاری در ژنوتیپ G_5 (۱۸۱/۰۹ درصد) مشاهده شد. در ژنوتیپ‌های G_2، G_4 و G_{10} نیز میزان فلاونوئید کل نیز افزایش یافت (شکل ۳، C).



شکل ۳- برهمکنش آبیاری × ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (A)، محتوای فنل کل (B) و فلاونوئید کل (C) ژنوتیپ‌های مختلف اُرس

Figure 3- The interaction effect of irrigation ×genotype on superoxide dismutase activity (A), total phenol (B), and total flavonoid (C) contents of the various genotypes of *Juniperus*. (DMRT, $p≤0.05$)

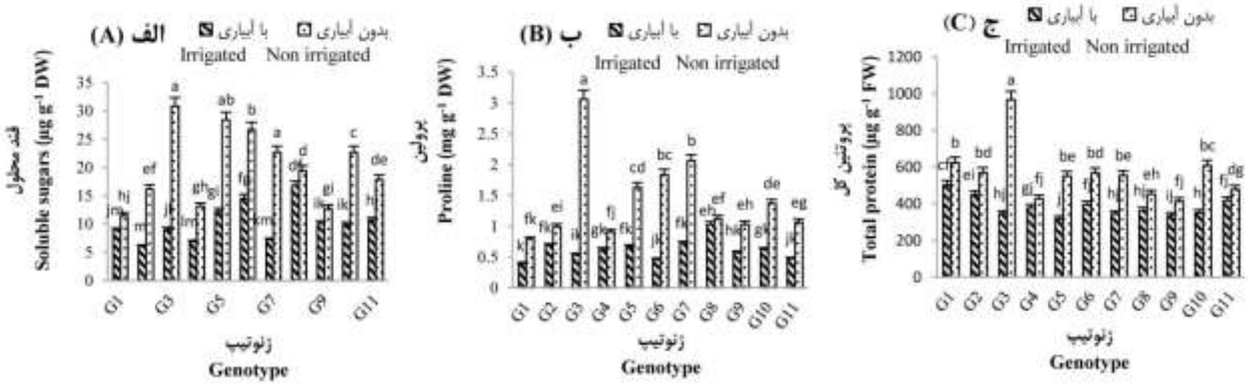
سلول‌های گیاهی قادرند از طریق القاء سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بر تنش اکسیداتیو ایجاد شده غلبه کنند. مقاومت گیاه به تنش‌های مختلف محیطی ممکن است با سطح فعالیت آنزیم‌های مسئول به دام انداختن رادیکال‌های آزاد اکسیژن مرتبط باشد. پاسخ آنتی‌اکسیدان‌ها به کمبود آب، به شدت تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. گونه‌های گیاهی مقاوم معمولاً ظرفیت حفاظتی کارآمدتری در مقابل تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش کم آبی دارند که می‌تواند از طریق بالا بردن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و ترکیبات آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی افزایش پیدا کند (Ahmad *et al*., 2011). پراکسید هیدروژن یک ترکیب سمی برای سلول‌هاست و باید به سرعت توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به آب و اکسیژن تبدیل شود. در غیر این صورت می‌تواند از طریق پراکسیداسیون لیپیدها به غشا سلولی، پروتئین‌ها و DNA آسیب وارد کند و از فرآیند فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های دیگر جلوگیری کند (Farooq *et al*., 2009). چندین آنزیم سطوح ROS را درون سلول تنظیم می‌کند که یکی از مهم‌ترین آنها سوپراکسید دیسموتاز (SOD) است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اولین سد دفاعی را تشکیل می‌دهد. سپس پراکسید هیدروژن حاصله می‌تواند در مراحل بعدی توسط آنزیم‌هایی نظیر آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز پاکسازی شود. کنترل سطح آنیون سوپراکسید توسط SOD مکانیسم حفاظتی مهمی در مقابل تنش اکسیدی در سلول می باشد، با افزایش فعالیت SOD میزان H_2O_2 بیشتر می‌شود که برای سلول سمی است (Wu *et al*., 2008). نتایج این مطالعه نشان داد که تنش خشکی باعث القا تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ‌های مورد بررسی اُرس گردید که افزایش مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن آن را تایید کرد (شکل ۲، A و B). بنابراین ژنوتیپ‌های مختلف اُرس برای کاهش اثرات تنش اکسیداتیو فعالیت آنزیم SOD و ترکیبات آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها را افزایش دادند (شکل ۳، A تا C). افزایش غلظت فنل‌ها و فلاونوئیدها در اُرس تحت تنش خشکی نشان می‌دهد که مکانیسم‌های غیرآنزیمی نیز برای غلبه بر تنش اکسیداتیو نقش دارند. حضور گونه‌های فعال اکسیژن در تنش خشکی سبب سنتز فنل‌ها و فلاونوئیدها برای مقابله با نسبت‌های زیاد

تولید پراکسید هیدروژن می‌گردد. افزایش این ترکیبات به ترتیب در ژنوتیپ‌های G8 و G5 نسبت به سایر ژنوتیپ‌های اُرس بیشتر بود که

نشـان دهنـده ظرفیـت بـالاتر بـرای بـه دام انـداختن ROS در ایـن ژنوتیپ‌ها است. بنابراین آسیب به لیپیدهای غشایی تحت تنش خشکی در این ژنوتیپ‌ها کمتر است. پژوهش‌ها نشان داد که خشکی فعالیـت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز را در شـاخه‌هـای نهـال بـذری *Juniperus oxycedrus* افـزایش داد (Alguacil *et al.*, 2006). همچنین تنش خشکی بر محتوای فنل کـل و فلاونوئیـدهای چهار گونه سرو کوهی موثر بود (Tavares *et al.*, 2012).

محتوای قندهای محلول، پرولین و پروتئین محلول کل

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، محتوای قندهای محلول، پرولین و پروتئین‌های محلول کـل در ژنوتیـپ‌هـای مختلـف اُرس بـه طـور معنی‌داری تحت تاثیر آبیاری و ژنوتیپ قرار گرفت ($p\leq$۰/۰۵). تـنش خشکی باعث افزایش غلظت متابولیت‌هـای سـازگار در ژنوتیـپ‌هـای مورد بررسی شد. بیشترین میزان قندهای محلول در مقایسه بـا زمـان آبیاری در ژنوتیپ G_3 برابر ۲۴۲/۲۲ درصد بدست آمد. همچنـین ایـن تنش موجب افزایش محتوای قندهای محلول در ژنوتیپ‌های G_2، G_5، G_7 و G_{10} به ترتیب ۱۶۹، ۱۳۳/۴۷، ۲۱۷/۵۳ و ۱۳۰/۳۱ درصد نسبت بـه گیاهـان شـاهد گردیـد (شـکل ۴، A). از طرفـی در ژنوتیـپ G_3، افزایش ۵/۷۵ برابری پرولین و افزایش ۱۸۰ درصدی پروتئین نسبت به زمان آبیاری نیز مشاهده شد. محتوای پرولین در ژنوتیپ‌های G_5، G_6، G_7، G_{10} و G_{11} بـه ترتیـب افـزایش ۲/۴۵، ۴، ۲/۸۴، ۲/۱۹ و ۲/۲۵ برابری در مقایسه با زمان آبیاری نشان دادند (شکل ۴، B و C).



شکل ۴- برهمکنش آبیاری × ژنوتیپ بر محتوای قندهای محلول (A)، پرولین (B) و پروتئین کل (C) ژنوتیپ‌های مختلف اُرس

Figure 4- The interaction effect of irrigation ×genotype on soluble sugars (A), proline (B), and total protein (C) contents of the various genotypes of *Juniperus*. (DMRT, $p\leq0.05$)

تجمع متابولیت‌های سازگار مانند قندهای محلـول، پـروتئین‌هـا و پرولین در گیاهان در شرایط کم آبی می‌تواند به حفاظت آنها در مقابل تنش کمک کند. افزایش محتوای قندهای محلـول در شـرایط تـنش خشکی ممکن است ناشی از کاهش نیاز به مواد فتوسنتزی بـه دلیـل کاهش رشد و افـزایش فعالیـت آنـزیم‌هـای اینورتـاز و آمـیلاز باشـد. بنابراین قندهای محلول می‌توانند به عنوان عامل اسـمزی عـلاوه بـر حفظ آماس سلول، امکان جذب و نگهداری آب را فراهم کنند و یا بـا ایجاد لایه‌های محافظتی اسمزی به عنوان جانشینی بـرای آب عمـل کنند و با دنباله‌های قطبی پلی‌پپتیدها و گروه‌های فسفات فسفولیپیدها از ساختار پروتئین‌ها و غشاهای سـلول محافظـت مـی‌کننـد و سـبب مقاومت گیاه در برابر تنش خشکی می‌شوند (Farooq *et al.*, 2009). در این پژوهش، افزایش قندهای محلول در ژنوتیپ‌های مختلف اُرس به خصوص ژنوتیپ G3 در شرایط خشکی می‌توانـد نقـش مهمـی در تنظیم اسمزی داشته باشد که به بهبود روابط آبی ژنوتیپ‌های مختلف اُرس در این شرایط کمک می‌کند و این یک سازگاری برای تحمل به خشکی باشد که به بقا و تولید در شرایط خشکی کمک می‌کند. نتـایج مشابهی از افزایش قندهای محلول در درختان هلو در شرایط خشـکی نیز گزارش شده است (Jimenez *et al.*, 2013).

پرولین به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی در گیاهان عمل مـی‌کنـد و در پایداری غشاها و پروتئین‌هـا در شـرایط تـنش نقـش دارد. تجمـع پرولین در شرایط تنش سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شـود و به عنوان پالایش‌کننده رادیکال آزاد عمل می‌کنـد. پـرولین از طریـق مکانیسم‌های مختلـف شـامل تنظـیم وضـعیت اسـمزی، سـم‌زدایـی گونه‌های فعال اکسیژن و پایداری آنزیم‌ها یا پروتئین‌ها، گیاهـان را در مقابل تنش‌های محیطی محافظت می‌کند. در برخی از گیاهـان ثابـت شده است که تغییرات میزان پرولین با توانایی آنهـا بـرای تحمـل یـا سازش به شرایط تنش مرتبط است و می‌تواند به عنوان شاخصی برای انتخاب گیاهان مقاوم به تنش استفاده شود (Dolatabadian *et al.*, 2009). بـر اسـاس نتـایج ایـن پـژوهش، تـنش خشـکی تجمـع متابولیت‌های سازگار نظیر قندهای محلول و پرولین را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه اُرس القا کرد و بیشـترین میـزان تجمـع قنـد محلـول و پرولین در ژنوتیپ G3 به میزان قابل توجهی بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها

بود. لذا این ژنوتیپ می‌تواند به عنوان ژنوتیپ مقاوم به خشکی معرفی شود. تجمع پرولین در پاسخ به تنش‌ها در میان گونه‌های گیاهی مانند مرکبات (Fifaei *et al.*, 2015) و آلبالو (Nyarukowa *et al.*, 2016) در شرایط خشکی گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که تنش خشکی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی را در یازده ژنوتیپ اُرس به میزان قابل توجهی تحت تاثیر قرار داد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این آزمایش رفتارهای مختلفی در برابر تنش خشکی نشان دادند و از مسیرهای مختلفی برای تحمل به تنش بهره بردند. ژنوتیپ‌هایی با نشت یونی بیشتر، از تنش خشکی آسیب بیشتری دیده‌اند به طوری که تحت تنش خشکی به علت افزایش مالون دی آلدئید و پراکسیداسیون لیپیدها و به دنبال آن افزایش نشت یونی، ژنوتیپ‌های G1، G2 و G11 به عنوان ژنوتیپ‌های حساس به خشکی و ژنوتیپ‌های G3، G4 و G9 به عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش خشکی معرفی شده‌اند. علاوه بر این، نتایج این مطالعه تایید می‌کند که تفاوت بین ژنوتیپ‌ها برای تحمل تنش خشکی با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید متابولیت‌های سازگار مرتبط است. ژنوتیپ‌های G3 و G5 به دلیل افزایش فعالیت آنزیم SOD و افزایش تولید فلاونوئید کل و اسمولیت‌ها، مکانیسم حفاظتی کارآمدتری در مقابل آسیب اکسیداتیو تحت تنش خشکی نشان دادند و به عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش خشکی برای مناطق خشک پیشنهاد می‌شوند.

منابع

1- Tajvar Y., Fotouhi-Gazvini R., Hamidoghli Y., and Hassan-Sajedi R. 2011. Physiological and biochemical responses of peg mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. Journal of Plant Biology 9: 1-12. (In Persian with English abstract)

2- Fifaei R., Fotouhi-Gazvini R., Golein B., and Hamidoghli Y. 2015. The Effect of Drought Stress on the amount of proline, soluble sugars, malondialdehyde and pigments in commercial citrus bases in north of country. Journal Crop Improve 17(4): 939-952. (In Persian with English abstract)

3- Zarabi M.M., Talaei A., Soleimani A., and Haddad R. 2010. Physiological role and biochemical changes of six olive (*Olea europaea* L.) cultivars against drought stress. Journal of Horticultural Science 24(2): 234-244. (In Persian with English abstract)

4- Ahmad P., Jaleel C.A., and Sharma S. 2011. Antioxidative defence system, lipid peroxidation, proline metabolizing enzymes and biochemical activity in two genotypes of *Morus alba* L. subjected to NaCl stress. Russian Journal Plant Physlogy 57: 509-517. https://doi:10.1134/S1021443710040084.

5- Alguacil M.F., Caravaca P., Daz-Vivancos J.A., Hernandez L., and Roldan A. 2006. Effect of arbuscular mycorrhizae and induced drought stress on antioxidant enzyme and nitrate reductase activities in *Juniperus oxycedrus* L. grown in a composted sewage sludge-amended semi-arid soil. Plant and Soil 279: 209-218.

6- Ashraf M.A., Riaz M., and Saleem Arif M. 2018. Plant metabolites and regulation under environmental stress Edited by Parvaiz Ahmad, Mohammad Abass Ahanger., Vijay Pratap Singh, Durgesh Kumar Tripathi, Pravej Alam, Mohammad Nasser Alyemeni. Academic Press is an in print of Elsevier.

7- Bates L., Waldren S.P., and Tear D.I .1973. Rapid determination of free proline for water- stress studies. Plant and Soil 39: 205-207. http://dx.doi.org/10.1007/BF00018060.

8- Seleiman M., Al-Suhaibani N., Ali N., Akmal M., Alotaibi M., Rafay Y., Dindaroglu T., Hafiz A., and Battaglia M. 2021. Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. Plants 10: 259. https://doi.org/10.3390/plants10020259.

9- Boominathan R., and Doran P.M. 2002. Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumolator, Alyssum bertoloni. New Phytologist 156: 202-205. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00506.x.

10- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

11- Chang C., Yang M., Wen H., and Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal Food Drug Analysis 10: 178-182.

12- Dolatabadian A., Modares Sanavi S.A.M., and Sharifi M. 2009. Effect of ascorbic acid on antioxidant enzyme, proline accumulation and lipid peroxidation of Brassica napus L. under salt stress. Journal Agronomy Crop Science 194: 206-213. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00301.x.

13- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., and Barsa S.M. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy Sustainable Development 29: 185-212. https://doi.org/10.1051/agro:2008021.

14- Harinasut P., Poonsopa D., Roengmongkol K., and Charoensalaporn R. 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulburg cultivar. Asian Journal Scientific Research 29: 109-113.

15- Hosseini-Boldaji S.A., Khavari-Nejad R.A., Hassan-Sajedi R., Fahimi H., and Saadatmand S. 2012. Water availability effects on antioxidant enzyme activities lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Acta Physiologiea Plantarum 34: 1177-1186. http://doi.org/10.1007/s11738-011-0914-6.
16- Jimenez S., Dridi, J., Gutierrez D., Moret D., Jrigoyen J.J. Moreno M.A., and Gogorcena. Y. 2013. Physiological, biochemical and molecular responses in four prunus roots tocks submitted to drought stress. Tree Physiology 33: 1061-75. http://doi.org/10.1093/treephys/tpt074. Epub 2013 Oct 25.
17- Kholova J., Hasan C.T.M., Khocova M., and Vadie V. 2011. Doesa terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pear millet exposed to drought. Journal of Environmental Experimental Botany 71: 99-106.
18- Kochert G., Helebust J.A., and Craig J.S. 1978. Physiological methods: Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method, *Physiological methods*, Kochert, G., Eds., and Cambridge University: Press Cambridge, United Kingdom, PP: 13-16.
19-Laxa M., Liebthal M., Telman W., Chibani K., and Dietz K.J. 2019. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. Antioxidants 94: 1-31. http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.11.001.
20- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic membranes. Method in Enzymology 148: 350-382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1.
21- Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., and Nacoulma O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and pralin contents in *Burkina fasan* honey, as well as their scavenging activity. Food Chemistry 91: 571-577. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006.
22- Nyarukowa C., Koech R., Loots T., and Apostolides Z. 2016. A method for Short-time Withering Assessment of Probability for Drought Tolerance in *Camellia sinensis* validated by targeted metabolomics. Journal Plant Physiology 198: 39-48. http://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.004.
23- Sairam R.K., Veerabhadra-Rao K., and Srivastava G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163: 1037-1046. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00278-9.
24- Saleem M., Ashraf M., and Akram N.A. 2011. Salt (NaCl)-induced modulation in some key physio-biochemical attributes in okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Journal Agronomy Crop Science 197: 202-213. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00453.x.
25- Siripornadulsil S., Traina S., Verma D.P.S., and Sayre R.T. 2002. Molecular mechanisms of proline mediated to toxic heavy metals in transgenic microalgae. Plant Cell 14: 2837-2847. http://doi.org/10.1105/tpc.004853.
26- Tavares L., McDougall G.J., Fortalezas S., Stewart D., Ferreira R.B., and Santos C.N. 2012. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four Juniperus species found in Portugal. Food Chemistry 135: 562-570.
27- Wang X., Cai X., Wang Q., and Dai S.2016. Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. International Journal Molecular Science 17: 1-30. http://doi.org/10.3390/ijms17101706.
28- Winterbourn C.C., Mcgrath B.M., and Carrell R.W. 1977. Reactions involving superoxide and normal and unstable hemoglobins. Biochemical Journal 155: 493-502. http://doi.org/10.1042/bj1550493.
29- Wu Q.S., Xia R.X., and Zou Y.N. 2008. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. European Journal Soil Biology 44: 122-128. http://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.10.001.